

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005809

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-097260
Filing date: 30 March 2004 (30.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 09 June 2005 (09.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 0 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 7 2 6 0

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 9 7 2 6 0
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人理化学研究所
株式会社ダナフォーム
林崎 良英

2 0 0 5 年 5 月 2 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 DF16001J
【提出日】 平成16年 3月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 27/00
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 2 2 - 8
 【氏名】 林崎 良英
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号
 【氏名】 河合 純
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目 3 - 3 5 株式会社ダナフォーム内
 【氏名】 林 利藏
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目 3 - 3 5 株式会社ダナフォーム内
 【氏名】 神谷 守
【特許出願人】
 【識別番号】 503359821
 【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【特許出願人】
 【識別番号】 501293666
 【氏名又は名称】 株式会社ダナフォーム
【特許出願人】
 【識別番号】 597157174
 【氏名又は名称】 林崎 良英
【代理人】
 【識別番号】 100087000
 【住所又は居所】 東京都豊島区西池袋 1 - 5 - 1 1 - 4 0 4
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 上島 淳一
 【電話番号】 03-5992-2315
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 058609
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0316302
 【包括委任状番号】 0215162
 【包括委任状番号】 0212796

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

分析の対象である生体試料に超短パルスレーザー光を照射してアブレーションすることにより、前記生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、前記原子化した構成元素をイオン化し、前記イオン化した構成元素を分析することにより、前記生体試料中の分析を目的とする分子を分析する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記生体試料中の分析を目的とする分子に対して特異的な結合をする物質を直接的あるいは間接的に標識し、前記標識された物質が結合された分子を分析することにより、前記生体試料中の分析を目的とする分子を分析する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記生体試料中の分析を目的とする分子は、核酸である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記核酸を分析するための標識された特異的な結合をする物質が、ハイブリダイゼーションによって結合する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 5】

請求項 3 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記核酸を分析するための前記核酸の標識は、T U N E L 法による

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 6】

請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記生体試料中の分析を目的とする分子は、タンパク質である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記タンパク質を分析するための標識された特異的な結合をする物質が、抗原抗体反応によって結合する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 8】

請求項 2、3、4、5、6 または 7 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記標識は、元素標識である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記元素標識は、安定同位元素標識である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 10】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記イオン化した構成元素の分析は、質量分析である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、
前記質量分析は、飛行時間法による質量分析である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 1 2】

請求項 2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

標識として複数種の標識を用いることによりマルチチャンネル化し、分析の目的の分子として同一の生体試料中の少なくとも 2 種類以上の分子を分析する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 1 3】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記生体試料を顕微鏡で観察して得られた組織像と、前記アブレーションしたスポットの位置とを対応させることにより、分析の目的とする分子の前記生体試料内局在を分析する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 1 4】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 または 13 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が 1 フェムト秒以上 1 ピコ秒以下であり、
尖頭値出力が 1 メガワット以上 10 ギガワット以下である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 1 5】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記生体試料は、生体組織切片である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

【請求項 1 6】

分析の対象である生体試料に照射して、該生体試料をアブレーションすることにより、
前記生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、前記原子化した構成元素をイオン化する超短パルスレーザー光を出射可能な超短パルスレーザー発生装置と、

前記超短パルスレーザー発生装置から出射された超短パルスレーザー光によってイオン化された構成元素を導入して分析する分析器と、

前記分析の対象である生体試料の形状を観察するための顕微鏡装置と

を有することを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、
前記顕微鏡装置は、正立顕微鏡装置であり、

前記正立顕微鏡装置の対物レンズを前記生体試料の上面に配置するとともに、前記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を前記生体試料の下面から行う

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、
前記顕微鏡装置は、正立顕微鏡装置であり、

前記正立顕微鏡装置の対物レンズを前記生体試料の上面に配置するとともに、前記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を前記生体試料の上面から行う

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

【請求項 19】

請求項 16 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、

前記顕微鏡装置は、倒立顕微鏡装置であり、

前記倒立顕微鏡装置の対物レンズを前記生体試料の下面に配置するとともに、前記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を前記生体試料の上面から行う

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

【請求項 20】

請求項 16 に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、

前記顕微鏡装置は、倒立顕微鏡装置であり、

前記倒立顕微鏡装置の対物レンズを前記生体試料の下面に配置するとともに、前記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を前記生体試料の下面から行う

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

【請求項 21】

請求項 16、17、18、19 または 20 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、

前記超短パルスレーザー発生装置は、パルス時間幅が 1 フェムト秒以上 1 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が 1 メガワット以上 10 ギガワット以下である超短パルスレーザー光を出射する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

【請求項 22】

請求項 16、17、18、19、20 または 21 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、さらに、

前記顕微鏡装置により観察された画像を解析する画像解析装置と

を有することを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

【請求項 23】

請求項 16、17、18、19、20、21 または 22 のいずれか 1 項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、

前記生体試料は、生体組織切片である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 レーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置

【技術分野】

【0001】

本発明は、レーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置に関し、さらに詳細には、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置に関し、例えば、生体試料として生体組織切片を用い、当該生体組織切片中の核酸の質量分析に用いて好適なレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置に関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、生体組織切片などの生体試料の分析の手法としては、種々の化学染色方法や核酸プローブのハイブリダイゼーションを利用した方法（*in situ*ハイブリダイゼーション法）などが主に使用されている。

【0003】

ここで、化学染色方法は、組織内に含まれる物質の種類によって染色のされ方が異なることを利用し、組織、細胞の形態、解析対象となる物質の存在の有無や局在を顕微鏡下で観察するという手法である。

【0004】

一方、*in situ*ハイブリダイゼーション法は、標識した核酸プローブと組織内に存在する核酸をハイブリダイゼーションさせて、細胞内で転写されているmRNAの検出や遺伝子の転写活性を観測することを可能とした手法である。

【0005】

また、生体組織切片などの生体試料の分析には、上記した手法と同様に、標識抗体を用いた組織切片の解析などもよく使われている。

【0006】

しかしながら、上記した従来の各種の生体試料の分析の手法においては、染色や発色にかかる工程が煩雑で、分析に要する時間が長時間におよぶという問題点があった。

【0007】

また、上記した従来の各種の生体試料の分析の手法においては、処理後の生体組織切片などを人が顕微鏡下で観察して解析する必要があるため、定性的な解析が主であるとともに、同じ切片を観察しても観察者の熟練度や主観により結果が異なるという問題点があった。

【0008】

さらに、上記した従来の各種の生体試料の分析の手法においては、同じ生体組織切片では一度に2種類の遺伝子しか測定することができないため、生体組織切片に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数遺伝子の解析を行うことが困難であるという問題点があった。

【0009】

なお、本願出願人が特許出願時に知っている先行技術は、上記において説明したようなものであって文献公知発明に係る発明ではないため、記載すべき先行技術情報はない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、上記したような従来の技術の有する種々の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、従来の技術と比較すると分析に要する時間を大幅に短縮することを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置提供しようとするものである。

【0011】

また、本発明の目的とするところは、観察者により分析結果が左右されることのないようにして、信頼性の高い結果を得ることを可能にした生体試料の分析方法およびその装置提供しようとするものである。

【0012】

また、本発明の目的とするところは、同一の生体試料上で一度に多数の遺伝子などを分析することができるようにして、作業労力的ならびに時間的な効率を向上するとともに、生体試料に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数の遺伝子などの解析を行うことを可能にした生体試料の分析方法およびその装置提供しようとするものである。

【0013】

また、本発明の目的とするところは、生体試料中の分子の質量分析を行う場合には、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除するとともに、質量分析器に高分解能を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置を提供しようとするものである。

【0014】

また、本発明の目的とするところは、生体試料中の分子を構成する構成原子の原子化とイオン化とを1台のレーザー源で同時に実現することを可能にして、レーザーの照射制御を大幅に簡潔にすることを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置を提供しようとするものである。

【0015】

また、本発明の目的とするところは、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

上記目的を達成するために、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置は、生体試料を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、生体試料中の分子を原子イオン化して原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたものである。これにより、生体試料中の分子の化学分析を行うことができるものである。

【0017】

即ち、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置においては、生体試料を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、生体試料中の分子をバラバラに分解して当該分子を構成する各原子毎に原子化すると同時に、原子化した原子を1価のイオンにイオン化するものであり、このイオン化により生成された原子イオンを分析することにより、定量分析が可能となるものである。

【0018】

従って、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、例えば、核酸プローブをハイブリダイゼーションするまでの工程（約2時間程度の工程である。）は従来の *In situ* ハイブリダイゼーションと同じであるが、その後の発色や増感にかかる時間（約24時間程度）を必要とせず、そのまま分析器にかけることができるため、分析に要する時間を大幅に短縮することが可能となる。

【0019】

また、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、分析結果は、定量的なデータとして産出されるため、観察者によるバラツキがなく信頼性の高い結果を得ることが可能となる。

【0020】

さらに、上記した従来に技術による手法では、同じ生体試料では一度に2～3種類の遺伝子しか測定することができないが、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、標識として使用できる種類が非常に多いため同一生

体試料上で一度に多数の遺伝子などを測定することができ、これにより労力的ならびに時間的な効率を向上することができるようになるとともに、同一生体試料上で分析できるように、生体試料に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数遺伝子などの解析を行うことが可能となる。

【 0 0 2 1 】

また、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置により質量分析を行う場合には、低質量の原子イオンを質量分析することになり、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができるのみならず、高分解能を備えた質量分析器を用いる必要がなくなる。

【 0 0 2 2 】

また、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、一種類の超短パルスレーザー光で生体試料をアブレーションすることにより、生体試料中の分子の原子化と同時に、原子化された原子の一価のイオンへのイオン化を効率良く行うことが可能となる。従って、レーザーの照射制御が簡潔になるとともに、例えば、化学分析に際して多種類の標識元素を同時に使用することが可能となるため、解析効率を著しく向上することができる。

【 0 0 2 3 】

つまり、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置においては、標識元素の原子化とイオン化とを一種類の超短パルスレーザー光で同時に行うことができるため、分析作業を大幅に簡略化することが可能となり、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することができるようになる。

【 0 0 2 4 】

さらに、上記したイオン化は、超短パルスレーザー光の高い尖頭値強度によって非共鳴過程によって行われるイオン化（非共鳴イオン化）であるので、多種類の標識同位体が混入した状況においても各標識原子をそれぞれイオン化することができ、多標識系への応用が容易であり、高精度かつ高効率な高分子の解析を行うことができるようになる。

【 0 0 2 5 】

即ち、本発明のうち請求項 1 に記載の発明は、分析の対象である生体試料に超短パルスレーザー光を照射してアブレーションすることにより、上記生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、上記原子化した構成元素をイオン化し、上記イオン化した構成元素を分析することにより、上記生体試料中の分析を目的とする分子を分析するようにしたものである。

【 0 0 2 6 】

また、本発明のうち請求項 2 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1 に記載の発明において、上記生体試料中の分析を目的とする分子に対して特異的な結合をする物質を直接的あるいは間接的に標識し、上記標識された物質が結合された分子を分析することにより、上記生体試料中の分析を目的とする分子を分析するようにしたものである。

【 0 0 2 7 】

また、本発明のうち請求項 3 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の本発明において、上記生体試料中の分析を目的とする分子を核酸としたものである。

【 0 0 2 8 】

また、本発明のうち請求項 4 に記載の発明は、本発明のうち請求項 3 に記載の発明において、上記核酸を分析するための標識された特異的な結合をする物質を、ハイブリダイゼーションによって結合するようにしたものである。

【 0 0 2 9 】

また、本発明のうち請求項 5 に記載の発明は、本発明のうち請求項 3 に記載の発明において、上記核酸を分析するための上記核酸の標識は、T U N E L 法によるようにしたものである。

【 0 0 3 0 】

また、本発明のうち請求項 6 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記生体試料中の分析を目的とする分子をタンパク質としたものである。

【 0 0 3 1 】

また、本発明のうち請求項 7 に記載の発明は、本発明のうち請求項 6 に記載の発明において、上記タンパク質を分析するための標識された特異的な結合をする物質を、抗原抗体反応によって結合するようにしたものである。

【 0 0 3 2 】

また、本発明のうち請求項 8 に記載の発明は、本発明のうち請求項 2、3、4、5、6 または 7 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記標識を元素標識としたものである。

【 0 0 3 3 】

また、本発明のうち請求項 9 に記載の発明は、本発明のうち請求項 8 に記載の発明において、上記元素標識を安定同位元素標識としたものである。

【 0 0 3 4 】

また、本発明のうち請求項 10 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記イオン化した構成元素の分析を質量分析としたものである。

【 0 0 3 5 】

また、本発明のうち請求項 11 に記載の発明は、本発明のうち請求項 10 に記載の発明において、上記質量分析を飛行時間法による質量分析としたものである。

【 0 0 3 6 】

また、本発明のうち請求項 12 に記載の発明は、本発明のうち請求項 2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 のいずれか 1 項に記載の発明において、標識として複数種の標識を用いることによりマルチチャンネル化し、分析の目的の分子として同一の生体試料中の少なくとも 2 種類以上の分子を分析するようにしたものである。

【 0 0 3 7 】

また、本発明のうち請求項 13 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記生体試料を顕微鏡で観察して得られた組織像と、上記アブレーションしたスポットの位置とを対応させることにより、分析の目的とする分子の上記生体試料内局在を分析するようにしたものである。

【 0 0 3 8 】

また、本発明のうち請求項 14 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 または 13 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が 1 フェムト秒以上 1 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が 1 メガワット以上 10 ギガワット以下であるようにしたものである。

【 0 0 3 9 】

また、本発明のうち請求項 15 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記生体試料を生体組織切片としたものである。

【 0 0 4 0 】

また、本発明のうち請求項 16 に記載の発明は、分析の対象である生体試料に照射して、該生体試料をアブレーションすることにより、上記生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、上記原子化した構成元素をイオン化する超短パルスレーザー光を出射可能な超短パルスレーザー発生装置と、上記超短パルスレーザー発生装置から出射された超短パルスレーザー光によってイオン化された構成元素を導入して分析する分析器と、上記分析の対象である生体試料の形状を観察するための顕微鏡装置とを有するようにしたものである。

【 0 0 4 1 】

また、本発明のうち請求項 17 に記載の発明は、本発明のうち請求項 16 に記載の発明において、上記顕微鏡装置を正立顕微鏡装置とし、上記正立顕微鏡装置の対物レンズを上記生体試料の上面に配置するとともに、上記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を上記生体試料の下面から行うようにしたものである。

【0042】

また、本発明のうち請求項 18 に記載の発明は、本発明のうち請求項 16 に記載の発明において、上記顕微鏡装置を正立顕微鏡装置とし、上記正立顕微鏡装置の対物レンズを上記生体試料の上面に配置するとともに、上記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を上記生体試料の上面から行うようにしたものである。

【0043】

また、本発明のうち請求項 19 に記載の発明は、本発明のうち請求項 16 に記載の発明において、上記顕微鏡装置を倒立顕微鏡装置とし、上記倒立顕微鏡装置の対物レンズを上記生体試料の下面に配置するとともに、上記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を上記生体試料の上面から行うようにしたものである。

【0044】

また、本発明のうち請求項 20 に記載の発明は、本発明のうち請求項 16 に記載の発明において、上記顕微鏡装置を倒立顕微鏡装置とし、上記倒立顕微鏡装置の対物レンズを上記生体試料の下面に配置するとともに、上記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を上記生体試料の下面から行うようにしたものである。

【0045】

また、本発明のうち請求項 21 に記載の発明は、本発明のうち請求項 16、17、18、19 または 20 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記超短パルスレーザー発生装置を、パルス時間幅が 1 フェムト秒以上 1 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が 1 メガワット以上 10 ギガワット以下である超短パルスレーザー光を出射するようにしたものである。

【0046】

また、本発明のうち請求項 22 に記載の発明は、本発明のうち請求項 16、17、18、19、20 または 21 のいずれか 1 項に記載の発明において、さらに、上記顕微鏡装置により観察された画像を解析する画像解析装置とを有するようにしたものである。

【0047】

また、本発明のうち請求項 23 に記載の発明は、本発明のうち請求項 16、17、18、19、20、21 または 22 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記生体試料を生体組織切片としたものである。

【0048】

ここで、本発明において超短パルスレーザー光により生体試料をアブレーションする際には、生体試料に超短パルスレーザー光を 1 ショット（1 パルス）照射すれば十分である。しかしながら、生体試料に超短パルスレーザー光を複数ショット（複数パルス）照射してもよく、生体試料へ照射する超短パルスレーザー光のショット数（パルス数）は適宜に選択すればよい。

【0049】

また、超短パルスレーザー光とは、パルス時間幅が 10 ピコ秒以下であることが好ましく、例えば、パルス時間幅が 1 フェムト秒以上 1 ピコ秒以下の通常はフェムト秒レーザーと称されるレーザーから照射されるフェムト秒レーザー光を用いるのが適当である。

【0050】

また、超短パルスレーザー光の尖頭値出力としては、1 メガワット以上が好ましく、さらに詳細には、1 メガワット以上 10 ギガワット以下が好ましい。

【0051】

その理由は、超短パルスレーザー光の尖頭値出力が 10 ギガワット以上に大きいと、多価イオンが生成されて質量スペクトルの解析が困難となる恐れがあり、超短パルスレーザー光の尖頭値出力が 1 メガワット以下であると、原子化・イオン化の効率が低下して原子

イオン信号を観測することが困難となる恐れがあるからである。

【0052】

なお、後述する本願発明者による実験によれば、例えば、パルス時間幅が100フェムト秒、レーザーパワー0.2mJの場合には、極めて良好な結果を得ることができた。

【0053】

また、本発明によれば、原子化と同時にイオン化を効率良く行うことのできるフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を、同位元素などで標識した核酸に照射するようにしている。このため、標識元素を選択的にイオン化する必要が無くなり、種々様々な標識元素を使用することが可能となる。その上、レーザー照射の繰り返しレートを数kHzまで上げることが可能であるため、高速解析に適している。

【0054】

また、本発明では、生体試料中の分子をアブレーションする超短パルスレーザー光と当該分析の対象である生体試料とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、当該短パルスレーザー光により当該分析の対象である生体試料を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行うようにしている。即ち、本発明においては、例えば、超短パルスレーザー光のスポットと試料として分析の対象である生体試料との相対的な移動により、広い面積にわたって生体試料を遺漏・重複することなくアブレーションすることを可能にしている。

【0055】

本発明によれば、これらの特徴から、解析速度が従来と比較して格段に早くなる。

【0056】

また、本発明によれば、標識として元素標識を用いることが可能となる。さらに詳細には元素標識として、多種類の同位元素を用いることが可能となり、元素標識として、例えば、安定同位元素を用いれば、標識の種類は多種類の安定同位体の数(270種類)にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法(2~6種類)や放射性同位元素(約10種類)と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができることを意味している。

【0057】

より詳細には、生体試料中の分析を目的とする分子の標識として、例えば、周期律表において1族の安定同位体である ^{39}K 、 ^{41}K など、周期律表において16族の安定同位体である ^{32}S 、 ^{34}S など、周期律表において17族の安定同位体である ^{12}C 、 ^{13}C など、周期律表において遷移金属の安定同位体である ^{118}Sn 、 ^{120}Sn など、さらには、周期律表において8族Fe、周期律表において12族Hg、周期律表において15族I、Eu、Tb、SmおよびDyなどのランタノイドの安定同位元素で使うことが可能となる。

【0058】

ここで、現在利用されている標識と比較すると例えば、安定同位元素を使えば、標識の種類を270種にも増やすことができる。

【0059】

さらに、標識として複数種の標識を用いることによりマルチチャンネル化すると、分析の目的の分子として同一の生体試料中の少なくとも2種類以上の分子を分析することができる。

【0060】

このように、本発明によって、多種類の安定同位元素標識による高感度・高速質量分析法を確立することができるものであり、従って、本発明は、蛍光色素や放射性同位元素で標識を行っている全ての研究分野へ応用可能である。

【0061】

また、本発明によれば、標識元素に放射性同位元素を用いることなく、安定同位元素を用いることができるので、その場合には使用される施設に制限を受けないため、医療施設や民間企業への設置も可能となる。

【発明の効果】

【0062】

本発明は、従来の技術と比較すると、分析に要する時間を大幅に短縮化することができるという優れた効果を奏する。。

【0063】

また、本発明は、観察者により分析結果が左右されることのない、信頼性の高い結果を得ることができるという優れた効果を奏する。。

【0064】

また、本発明は、同一の生体試料上で一度に多数の遺伝子などを分析することができ、作業労力的ならびに時間的な効率を向上することができるとともに、生体試料に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数の遺伝子などの解析を行うことができるという優れた効果を奏する。

【0065】

また、本発明は、生体試料中の分子の質量分析を行う場合に、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができ、質量分析器に高分解能を必要とすることがないという優れた効果を奏する。

【0066】

また、本発明は、生体試料中の分子を構成する構成原子の原子化とイオン化とを1台のレーザー源で同時に実現することが可能となり、システム構成ならびにレーザーの照射制御を大幅に簡潔にすることができるという優れた効果を奏する。

【0067】

また、本発明は、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことができるという優れた効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0068】

以下、添付の図面を参照しながら、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置の実施の形態の一例を詳細に説明するものとする。

【0069】

本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、生体試料中の分子を分析することができるものであり、以下の説明においては、分析の対象の生体試料として、生体組織切片を用いた場合について説明する。

【0070】

なお、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置において分析の対象となる生体試料としては、生体組織切片の他に、例えば、塗抹試料（血液、喀痰）、培養細胞あるいは感染症検査などがある。

【0071】

図1には、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置の実施の形態の一例として、生体組織切片中の分子の質量分析を行う質量分析システムとして構成した本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置（以下、単に「分析装置」と適宜に称する。）の概念構成説明図が示されている。

【0072】

この分析装置10は、例えば $10^{-8} \sim 10^{-6}$ Torrの真空度に設定可能な真空槽12と、この真空槽12内に配置された分析対象の生体組織切片である試料のターゲット14と、真空槽12内に配置された質量分析器としての飛行時間型質量分析器（TOF質量分析器）16と、ターゲット14を回転する回転導入端子18と、例えばフェムト秒レ

レーザー光などの超短パルスレーザー光を出射してターゲット 14 へ照射する超短パルスレーザー発生装置 20 と、ターゲット 14 を観察するための顕微鏡装置 22 と、顕微鏡装置 22 で観察したターゲット 14 の像を解析するとともにその解析結果を表示する表示部 24 a を備えた画像解析装置 24 とを有している。

【0073】

なお、超短パルスレーザー発生装置 20 から照射された超短パルスレーザー光は、フォーカスレンズ（図示せず。）やミラー（図示せず。）などの光学系を介して、ターゲット 14 上へ集光される。

【0074】

ここで、詳細な図示は省略するが、顕微鏡装置 22 は、正立型の顕微鏡（正立顕微鏡）装置でも倒立型の顕微鏡（倒立顕微鏡）装置でもよい。

【0075】

また、顕微鏡装置 22 による観察と超短パルスレーザー発生装置 20 による超短パルスレーザー光の照射とは、両者をターゲット 14 の同一面から行ってよいし、互いに異なる面から行ってよい。即ち、ターゲット 14 の一方の面に超短パルスレーザー発生装置 20 から超短パルスレーザー光を照射するとともに、当該一方の面から顕微鏡装置 22 によりターゲット 14 の状態を観察するようにしてもよいし、また、ターゲット 14 の一方の面に超短パルスレーザー発生装置 20 から超短パルスレーザー光を照射するとともに、当該一方の面とは異なる他方の面から顕微鏡装置 22 によりターゲット 14 の状態を観察するようにしてもよいものであり、超短パルスレーザー発生装置 20 による超短パルスレーザー光の照射によるターゲット 14 の変化の状態を *in situ* でリアルタイムに観察することができる。

【0076】

具体的には、顕微鏡装置 22 として正立顕微鏡装置を用いた場合には、正立顕微鏡装置の対物レンズをターゲット 14 の上面に配置するとともに、超短パルスレーザー発生装置 20 からの超短パルスレーザー光の照射をターゲット 14 の下面から行うようにすることができる。

【0077】

同様に、顕微鏡装置 22 として正立顕微鏡装置を用いた場合に、正立顕微鏡装置の対物レンズをターゲット 14 の上面に配置するとともに、超短パルスレーザー発生装置 20 からの超短パルスレーザー光の照射もターゲット 14 の上面から行うようにしてもよい。さらに、この場合においては、正立顕微鏡装置の対物レンズを通して超短パルスレーザー光の照射が行われるようにしてもよい。

【0078】

一方、顕微鏡装置 22 として倒立顕微鏡装置を用いた場合には、倒立顕微鏡装置の対物レンズをターゲット 14 の下面に配置するとともに、超短パルスレーザー発生装置 20 からの超短パルスレーザー光の照射をターゲット 14 の上面から行うようにすることができる。

【0079】

同様に、顕微鏡装置 22 として倒立顕微鏡装置を用いた場合に、倒立顕微鏡装置の対物レンズをターゲット 14 の下面に配置するとともに、超短パルスレーザー発生装置 20 からの超短パルスレーザー光の照射もターゲット 14 の下面から行うようにしてもよい。さらに、この場合においては、倒立顕微鏡装置の対物レンズを通して超短パルスレーザー光の照射が行われるようにしてもよい。

【0080】

即ち、ターゲット 14 の一方の面に超短パルスレーザー発生装置 20 から超短パルスレーザー光を照射するとともに、当該一方の面から顕微鏡装置 22 によりターゲット 14 の状態を観察する場合には、顕微鏡装置 22 の対物レンズを通して超短パルスレーザー光の照射が行われるように配置してもよい。

【 0 0 8 1 】

また、超短パルスレーザー発生装置 20 としては、フェムト秒レーザーなどのような、例えば、パルス時間幅が 1 フェムト秒以上 1 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が 1 メガワット以上 10 ギガワット以下である超短パルスレーザー光を照射可能なものを用いることができる。

【 0 0 8 2 】

より詳細には、こうした超短パルスレーザー発生装置 20 は、例えば、チタンサファイアレーザーにより構成され、以下に示すようなパラメータを備えているものを用いることができる。即ち、

ピーク幅（パルス時間幅）：～ 1 1 0 f s （フェムト秒）
出力：5 0 ～ 4 8 0 μ J （マイクロジュール）
（尖頭値出力：0 . 5 ～ 4 G W （ギガワット））
波長：～ 8 0 0 n m （ナノメートル）
繰り返し：1 k H z （キロヘルツ）

である。

【 0 0 8 3 】

また、質量分析器としては、飛行時間型質量分析器に代えて、四重極質量分析器などの各種の質量分析器を用いるようにしてもよいことは勿論である。

【 0 0 8 4 】

また、超短パルスレーザー発生装置 20 から出射された超短パルスレーザー光を集光するフォーカスレンズの焦点距離は、例えば、2 5 c m に設定されている。

【 0 0 8 5 】

以上の構成において、上記した分析装置 10 を用いて生体組織切片中の分子の質量分析を行う手法について説明する。

【 0 0 8 6 】

ここで、本発明による生体組織切片中の分子の質量分析は、フェムト秒レーザーなどの超短パルスレーザー発生装置 20 から出射された超短パルスレーザー光によるアブレーションと、飛行時間型質量分析器 16 による分析とを用いて、生体組織切片中の分子の質量分析を行うものである。

【 0 0 8 7 】

即ち、本発明による生体組織切片中の分子の質量分析は、分析の対象である生体組織切片に超短パルスレーザー光を照射して当該生体組織切片をアブレーションすることにより、生体組織切片に含まれる分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するものである。

【 0 0 8 8 】

具体的には、生体組織切片をターゲット 14 として真空槽 12 内に配置し、ターゲット 14 たる生体組織切片に超短パルスレーザー発生装置 20 から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行い、飛行時間型質量分析器 16 により分析するものである。

【 0 0 8 9 】

この際に、分析の対象となる生体組織切片中の分子に元素標識などにより標識を付しておくようにすると、標識を付した分子を含む生体組織切片をターゲット 14 として真空槽 12 内に配置し、ターゲット 14 たる生体組織切片に超短パルスレーザー発生装置 20 から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行って、飛行時間型質量分析器 16 により標識元素を測定することにより、分析対象となる生体組織切片中の分子を検出して分析することができる。

【 0 0 9 0 】

ここで、超短パルスレーザー発生装置 20 から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光の照射位置は、あらかじめ生体組織切片たるターゲット 14 を顕微鏡装置 22 で観察して決定することができる。

【0091】

さらに、顕微鏡装置 22 により得られた生体組織切片たるターゲット 14 上におけるレーザー照射を行った各点での画像を、画像解析装置 24 により解析して、画像解析装置 24 の表示部 24 a において当該各点での標識元素の強度を色彩表示に変換した形でターゲット 14 たる生体組織切片画像上に表示し、生体組織切片の形態的特徴と計測結果を同時に視認することができるような処理を施すことにより、従来の *In situ* ハイブリダイゼーション法と同様の形式でデータを解析することが可能となる。

【0092】

また、超短パルスレーザー光によるアブレーションを行う分析装置 10 にターゲット 14 として生体組織切片をセットする前に、あらかじめ生体組織切片を顕微鏡装置 22 で観察し、生体組織切片に基準点を設け、これを基準としてレーザー照射位置の位置決めを行うことによって、顕微鏡装置 22 による観察画像と超短パルスレーザー光を用いたアブレーションにより計測した分子分析結果とをを対応させることもできる。

【0093】

以下、生体試料の作製の一例として、マウス脳をスライスして形成した生体組織切片の作製の手法について説明する。

【0094】

1. マウス脳の調製

動物：モデル動物として、オリエンタル酵母株式会社から購入した雄の 10 ～ 11 週齢の野生型 CD-1 マウスおよび C57BL/6J を用いた。

【0095】

こうしたマウスの脳の調製する際の試薬としての固定液は、以下の表 1 に示す通りである。

試薬:固定液

・ 中性固定液:1L 4% PFA (パラフォルムアルデヒド) 液(pH7.5)

PFA	40 g
Sucrose	40 g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	11.4 g
NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O	3.3 g

・ 酸性固定液:Original-Bouin 液(pH3.5～4.0)

Saturated picric acid	300 ml
Formalin	100 ml
Acetic acid	20 ml

【0096】

上記試薬を用いて、下記のような方法により、生体組織切片としてマウス脳のパラフィン切片ならびに凍結切片を作製した。

【0097】

<方法>

1) パラフィン切片の作製

マウスにエーテル麻酔し、痛覚反応がなくなった後、開腹し心臓を露出させ、氷冷した中性固定液、酸性固定液を20mlずつ順に心臓から流入させ灌流固定を行った。その後、脳を摘出し、酸性固定液中において4℃で3日間放置して固定した。

【0098】

固定した組織を薄切して切片を作製し、スライドグラスに貼付した。VENTANA社製自動in situ hybridization (in situハイブリダイゼーション) 装置を用いてパラフィン切片を作製した。

【0099】

2) 凍結切片の作製

エーテル麻酔下で脊椎脱臼後に脳を摘出し、OCTに包埋し液体窒素で凍結し、ライカ社製薄切機で切片を作成した。

【0100】

2. プライマーの設計

目的遺伝子のcDNA配列を理研FANTOMクローンから検索した。さらに、公共データベースのLocusLinkよりcDNAを参照して、目的となるcDNA配列を選択した。選択した塩基配列をアミノ酸配列に変換し、NCBI Protein BLASTでホモロジー検索した。ホモロジーの低い配列に相当するcDNA部分を同定し、鋳型として増幅させるためにプライマーを設計した。さらに、必要に応じて、ゲノムDNAからホモロジーの低い配列を鋳型として増幅させるためにプライマーを設計した。なお、遺伝子のLocusLink IDを表2に示す。

【表2】

遺伝子名	locus link
Tph2	NM_173391
MaoB	NM_172778
AADC	NM_016672
Htr1B	NM_010482

【0101】

3. プラズミッドの精製

機器として株式会社島津製作所製の分光光度計（Bio Spec-1600）およびApplied Biosystems社製のGeneAmp PCR System 9700を用い、試薬として表3に示すものを用いて、以下の方法によりプラズミッドの精製を行った。

試薬

- QIAprep Spin Miniprep Kit: QIAGEN
- TaKaRa Ex Taq™: TaKaRa
- MicroSpin™ Column: Amersham Pharmacia Biotech
- MinElute Gel Extraction Kit: QIAGEN
- DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7): Roche Diagnostics
- SP6/T7 Transcription Kit: Roche Diagnostics
- BD CHROMA SPIN Column: Clontech

【0102】

＜方法＞

大腸菌から Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p K i t を用いて、添付のプロトコールに従い、プラスミド DNA を精製し、分光光度計で吸光度を測定して、濃度を算出した。プラスミド DNA を鋳型として設計したプライマーを用いて、P C R を行った。反応液組成、反応条件は以下に示す。反応産物を 2 % のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。

【0103】

4. プローブの作製

1) 安定同位体標識 s s D N A プローブの作製

表 4 に示す反応液および反応条件により、安定同位体標識 s s D N A プローブを作製した。標識 d N T P には、パーキンエルマー社製の E u 標識 d U T P、S m 標識 d U T P、T b 標識 d U T P および D y 標識 d U P T を用いた。

【表 4】

反応液組成

	μl
Plasmid DNA(1ng/ μl)	0.5
F primer(25 μM)	1.0
10 x buffer	5.0
標識dNTP	1.0
dNTP Mixture	4.0
TaKaRa Ex Taq TM (5unit/ μl)	0.5
滅菌水	34.0
	50.0

反応条件

95°C 5min

95°C 1min

60°C 1min 30Cycles

72°C 1min

72°C 3min

4°C ∞

【0104】

P C R 産物をフェノール・クロロホルム抽出して、M i c r o S p i n（商標）カラムにより精製した。その精製産物をアガロースゲル上で確認した。

【0105】

2) D I G 標識 R N A プローブの作製

表5に示す反応液および反応条件により、D I G 標識 R N A プローブを作製した。

反応液組成

	μ l
Plasmid DNA(1ng/ μ l)	0.5
F primer(25 μ M)	1.0
R primer(25 μ M)	1.0
10 \times Buffer	5.0
dNTP Mixture	4.0
TaKaRa Ex Taq TM (5unit/ μ l)	0.5
滅菌水	34.0
	50.0

反応条件

95°C 5min

95°C 1min

60°C 1min 30Cycles

72°C 1min

72°C 3min

4°C ∞

【0106】

このPCR産物とT7とSP6ポリメラーゼの認識配列（*T7，SP6 adaptor）を含むプライマーを用い、再びPCRを行った。反応液組成、反応条件は表6に示す。反応産物を2%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。

【0107】

*T7 adaptor: GAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAG
GGC

SP6 adaptor: TTGTGCGGCCATTTAGGTGACACTATA

反応液組成

	μ l
1st PCR Product	0.5
SP6 adaptor (10 μ M)	2.5
T7 adaptor(10 μ M)	2.5
10 \times Buffer	5.0
dNTP Mixture	4.0
TaKaRa Ex Taq TM (5unit/ μ l)	0.5
滅菌水	34.0
	50.0

反応条件

95°C 5min

95°C 1min

60°C 1min 25Cycles

72°C 1min

72°C 3min

4°C ∞

【0108】

PCR産物をフェノール・クロロホルム抽出して、MicroSpin（商標）カラムにより精製した。

【0109】

次に、DIG標識RNAアンチセンスプローブおよびセンスプローブの作製について説

明する。

【0110】

即ち、アンチセンスプローブを作製時にT7ポリメラーゼ、センスプローブ作製時にはSP6ポリメラーゼを用い、表7に示す反応液組成で37℃で2時間インキュベートした。反応産物を1%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。

【表7】

反応液組成

	μ l
PCR 産物	10.0
10×Transcription buffer	2.0
NTP labeling mixture	2.0
RNase Inhibitor(40U/ μ l)	0.5
T7 or SP6 polymerase(20U/ μ l)	2.0
滅菌水	3.5
	20.0

【0111】

確認後、DNAを除去するためDNase I (10U/ μ l)を2 μ l加え、37℃で30分間インキュベートした。DNAが除去したかどうかを1%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。除去できていたら0.2M EDTAを2 μ l加え反応を停止させ、BD CHROMA SPIN Columnでプローブを精製した。

【0112】

5. ドット・プロット法によるプローブの定量

プローブ作製の結果、得られた標識DNAを正確に定量することは、ISHの結果を最適化し、再現性を持たせるのにきわめて重要である。そこで、既知量のスタンダードを希釈したものと実際にラベルした未知量のプローブの希釈系列と検体の希釈列とを並列にスポットし、レーザー照射法および抗DIG抗体を用いた発色法で検討した。

【0113】

以下、DIG標識プローブの定量について説明する。まず、使用する機器ならびに試薬について説明するものとする。

【0114】

機器として振とう機、UVクロスリンカーおよびナイロンメンブレン（Amersham Pharmacia Biotech Hybond-N）を用い、試薬として表8に示すものを用いて、以下の方法によりDIG標識プローブの定量を行った。

【表8】

試薬

- ・コントロール DIG-label DNA: Roche Diagnostics

- ・ TBS バッファー

0.5M Tris-Cl(PH7.4)

1.5M NaCl

- ・ Blocking Reagent

TBS-T(TBS,0.1%Tween20)

5%スキムミルク

- ・ APB バッファー(4°C)

100mM Tris-Cl(pH9.5)

50mM MgCl₂

100mM NaCl

- ・ Anti-DIG-AP: Roche Diagnostics、Lot1 093 274

- ・ NBT/BCIP 溶液

(ニトロブルーテトラゾリウム/ブロモクロロインドリルリン酸)

【0115】

<方法>

96穴プレートにコントロールRNAと作製したプローブの希釈系列を作り、各穴の希釈溶液を1μlずつナイロンメンブレン上にスポットした。メンブレンを風乾させた後、UVクロスリンカーで処理(120mJ/cm²)した。Blocking Reagentを加えた溶液にメンブレンを浸し、振とう機で10分間振とうさせた後、抗体反応を行うため、Anti-DIG-AP 5000倍希釈液で30分間振とうさせた。TBSバッファーでメンブレンを洗浄した後、NBT/BCIP溶液を加え振とうさせ発色反応を

行った。十分発色させた後、M i l l i Q 水を加え 1 0 分間振とうさせ発色反応を止めた。そして、流水で水洗し、風乾した後、ハイブリパックで密封し、コントロール R N A と作製したプローブのスポットシグナルを比較してプローブの定量を行った。

【0116】

6. i n s i t u ハイブリダイゼーション法

1) マーカー遺伝子のハイブリダイゼーション

図2に示すように、プローブにD I G 標識R N A プローブを用いて、アルカリフォスファターゼによる発色をV E N T A N A 社製自動I S H 装置で行った。

【0117】

2) 同時多数プローブを用いたハイブリダイゼーション

図3に示すように、プローブに同位体元素E u , S m , T b , D y を標識し、自動I S H 装置で前処理を行った後、S A W a g i t a t i o n 法 (A d v a l y t i x) を用いて短時間でハイブリダイゼーションを行った。

【0118】

M a p 2	マーカー遺伝子	D I G 標識	
T p h 2	目的遺伝子 1	S m 標識	N M — 1 7 3 3 9 1
M a o B	目的遺伝子 2	E u 標識	N M — 1 7 2 7 7 8
A A D C	目的遺伝子 3	D y 標識	N M — 0 1 6 6 7 2
H t r 1 B	目的遺伝子 4	T b 標識	N M — 0 1 0 4 8 2

3) 高感度ハイブリダイゼーション

図4に示すように、プローブにD I G 標識R N A プローブを用いて、チラミド増感法とA v i d i n 化E u を併用した増感法を用いて高感度ハイブリダイゼーションを行った。

【実施例】

【0119】

以下、生体試料として生体組織切片を用い、この生体組織切片に超短パルスレーザー光を照射してアブレーションし、生体組織切片を分析した結果について説明する。

【0120】

即ち、上記1～4において説明した手法によって得られたマウス脳の生体組織切片をターゲット14として用いて、分析装置10により分析を行った実験結果は、以下に示す通りである。

【0121】

この実験は、上記のようにして作製した生体組織切片をターゲット14として超短パルスレーザー発生装置20からのフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行い、飛行時間型質量分析器16により分析するものである。

【0122】

より詳細には、上記のようにして作製したターゲット14を真空槽12内に装着して、真空槽12内を真空に引いて、真空槽12内の真空度が 10^{-6} T o r r 以下となるように設定する。

【0123】

次に、超短パルスレーザー発生装置20から出射された超短パルスレーザー光を、フォーカスレンズなどの光学系を用いてターゲット14上に集光して、ターゲット14上に設定された領域をアブレーションする。

【0124】

そして、飛行時間型質量分析器16によって、ターゲット14への超短パルスレーザー光の照射により発生した一価のイオンの質量を測定する。

【0125】

ここで、図5は実験に用いた生体組織切片の顕微鏡装置22により観察した顕微鏡写真であり、マーカー遺伝子の局在をTSA増感ISH法を用いて示した。このプローブを用いると神経細胞を選択的に染色することが可能で、そのシグナルはレーザー照射の際のマーカーとなる。

【0126】

このマーカー遺伝子の位置を基点として、図5において四角形で囲んだ領域1～4を設定し、超短パルスレーザー発生装置20により超短パルスレーザー光の照射を行った。

【0127】

その超短パルスレーザー光の照射する際の条件は、

パルス幅：100fs（フェムト秒）

レーザーパワー：0.2mJ（ミリジュール）

である。

【0128】

上記照射条件により超短パルスレーザー光を領域1～4にそれぞれ照射し、超短パルスレーザー光の照射によって発生されたイオンを飛行時間型質量分析器16により測定して、それぞれの領域における標識元素を測定したところ、図6～9に示す質量スペクトルが得られた。

【0129】

即ち、上記した領域1に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルが図6に示され、領域2に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルが図7に示され、領域3に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルが図8に示され、領域4に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルが図9に示されている。

【0130】

上記した図6～9に示す質量スペクトルから、それぞれの標識原子に由来するピークに基づいて標識原子量を算出したものが、図10として示す図表にまとめられている。

【0131】

この図10に示すように、生体組織切片にフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射し、標識原子を計測することにより、生体組織切片中の遺伝子の発現を解析することができた。

【0132】

また、図11～14には、顕微鏡装置22および画像解析装置24を用いて、領域1～4におけるそれぞれ顕微鏡写真の画像上に、図10に示す領域1～4における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示している。なお、画像としてカラー画像を扱うようにすれば、強度分布をより詳細に示すことが可能となる。

【0133】

これら図11～14に示すように、分析装置10によれば、顕微鏡装置22により得られた生体組織切片たるターゲット14上におけるレーザー照射を行った領域1～4での画像を、画像解析装置24により解析して、画像解析装置24の表示部24aにおいて領域1～4での標識元素の強度を棒線表示や色彩表示に変換した形で領域1～4の片画像上に表示し、生体組織切片の形態的特徴と計測結果を同時に視認することができるようになる。

【0134】

なお、この実施例においては、各領域毎に各遺伝子に関する画像、即ち、領域1～4の各領域に対して遺伝子1～4についての4枚の画像を得るようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、カラー画像を用いて遺伝子の色を変えることにより、各領域毎の画像に複数の遺伝子の発現を示すことができるようによってもよい。

【0135】

なお、本発明においては、同位体元素で標識した分子それ自体を原子レベルでイオン化し、標識元素を検出することが可能となるから、質量分析可能な対象範囲を飛躍的に広げることができるようになる。例えば、標識として同位体元素を用いることが可能となり、標識の種類をたとえば安定同位体元素の数である 270 にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法（2 種類）や放射性同位元素（約 10 種類）と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができる。

【0136】

なお、上記した実施の形態においては、質量分析器として、原子の飛行時間を測定することにより質量分析を行う飛行時間型質量分析器を用いたが、飛行時間型質量分析器を用いた場合には、一回のレーザー照射で複数の原子の質量分析を同時に行うことができる。また、質量分析器としてイオンサイクロトロン型フーリエ変換質量分析器を用いた場合にも、複数の原子の質量分析を同時に行うことが可能となる。

【0137】

また、上記した実施の形態においては、分子の分析方法として質量分析に関して説明したが、これに限られるものではないことは勿論であり、質量分析以外の分析に関して本発明を用いるようにしてもよい。

【0138】

また、上記した実施の形態においては、ターゲット 14 を移動する移動手段として、ターゲット 14 を回転する回転導入端子 18 を用いたが、これに限られるものではないことは勿論であり、ターゲット 14 を載置可能な移動自在のテーブルなどの適宜の移動手段を用いるようにしてもよい。

【0139】

また、上記した実施の形態においては、回転導入端子 18 を用いてターゲット 14 を回転することにより、ターゲット 14 を遺漏・重複なくアブレーションするようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、超短パルスレーザー光のターゲットへの照射位置を移動する移動手段を設けるようにして、ターゲット 14 を遺漏・重複なくアブレーションするようにしてもよい。

【0140】

また、本発明においては、分析の対象とする目的の核酸を検出するための核酸の標識を、TUNEL 法により標識するようにしてもよい。

【0141】

また、本発明においては、生体組織切片に含まれる特定のたんぱく質の検出を行うようにしてもよい。

【0142】

また、本発明においては、目的とするタンパク質を検出するための標識された特異的な結合をする物質が、抗原抗体反応によって結合するようにしてもよい。

【産業上の利用可能性】

【0143】

本発明は、医学や生化学などのライフサイエンスの分野における生体組織の分析に利用されるものである。

【図面の簡単な説明】

【0144】

【図 1】本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体組織切片の分析装置の一例の概念構成説明図であり、生体組織切片中の分子の質量分析を行う質量分析システムとして構成した本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体組織切片の分析装置の概念構成説明図である。

【図 2】TAS 増感法による標識遺伝子の染色による *in situ* ハイブリダイゼ

ーションの原理の説明図である。

【図 3】 同時多数プローブを用いたハイブリダイゼーションの原理の説明図である。

【図 4】 単一プローブ増感法による *in situ* ハイブリダイゼーションの原理の説明図である。

【図 5】 実験に用いた生体組織切片の顕微鏡写真である。

【図 6】 領域 1 に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルを示すグラフである。

【図 7】 領域 2 に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルを示すグラフである。

【図 8】 領域 3 に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルを示すグラフである。

【図 9】 領域 4 に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルを示すグラフである。

【図 10】 図 6～9 に示す質量スペクトルからそれぞれの標識原子に由来するピークに基づいて標識原子量を算出したものを示す図表である。

【図 11】 領域 1 における顕微鏡写真の画像上に、図 10 に示す領域 1 における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示した画像である。

【図 12】 領域 2 における顕微鏡写真の画像上に、図 10 に示す領域 2 における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示した画像である。

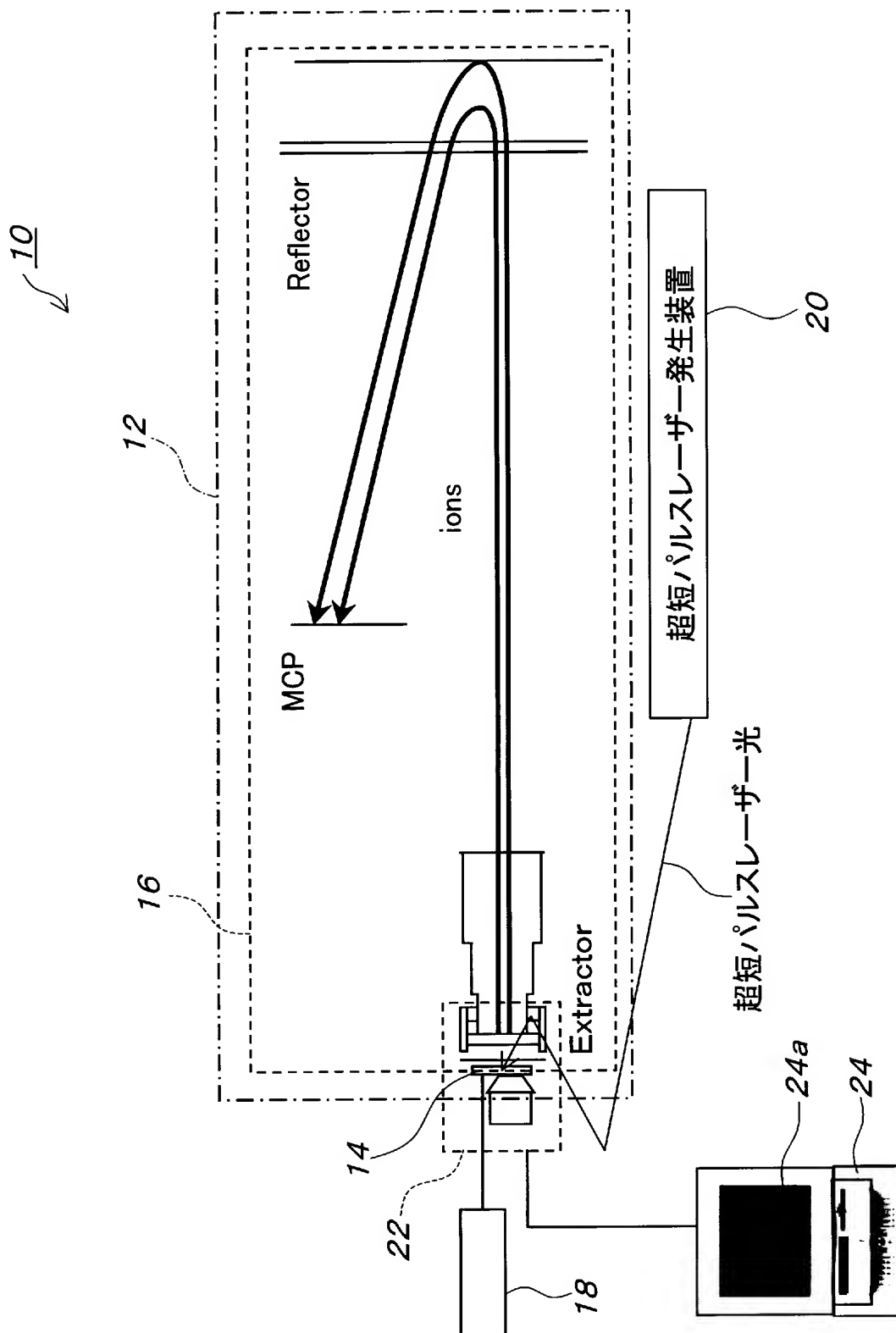
【図 13】 領域 3 における顕微鏡写真の画像上に、図 10 に示す領域 3 における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示した画像である。

【図 14】 領域 4 における顕微鏡写真の画像上に、図 10 に示す領域 4 における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示した画像である。

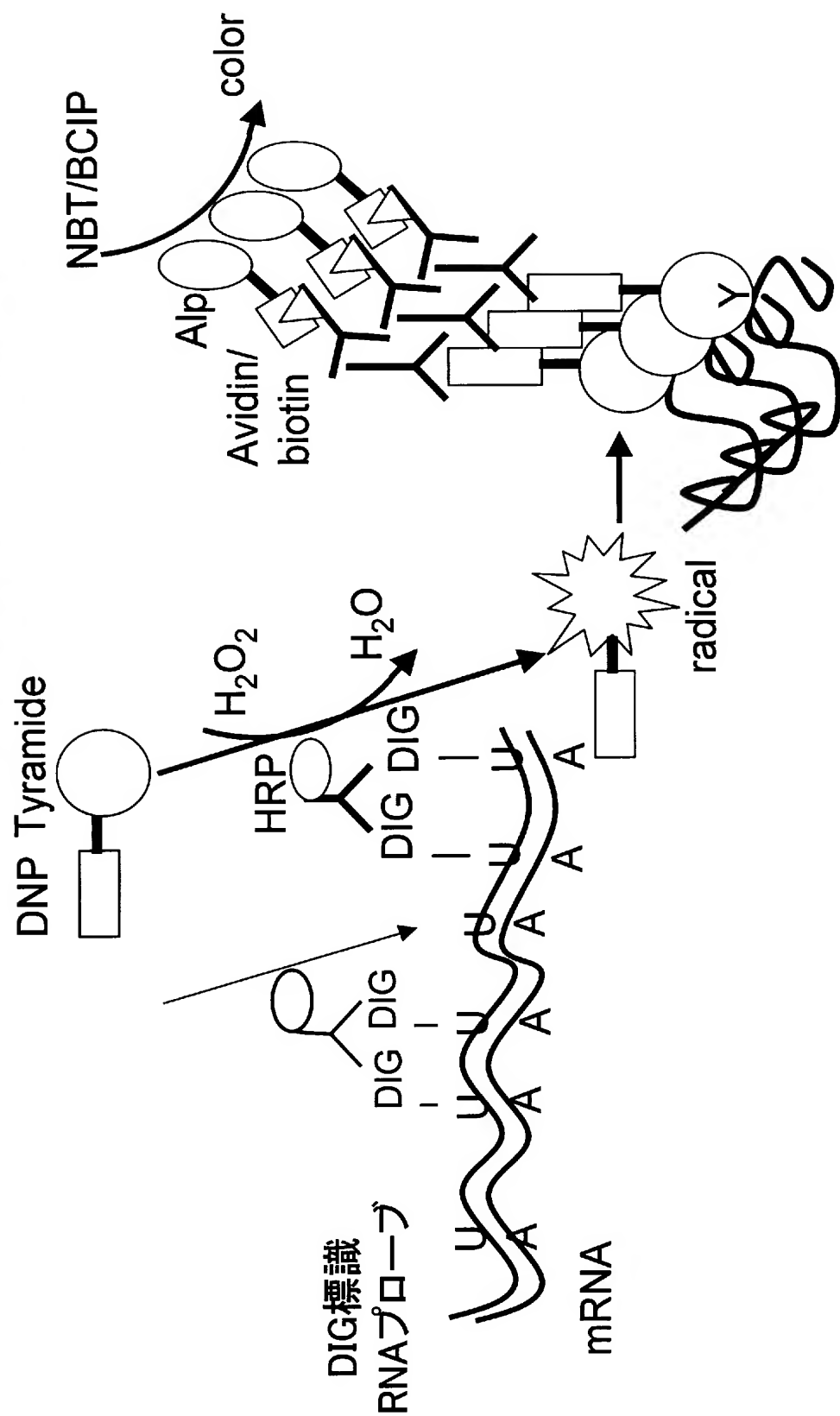
【符号の説明】

【0 1 4 5】

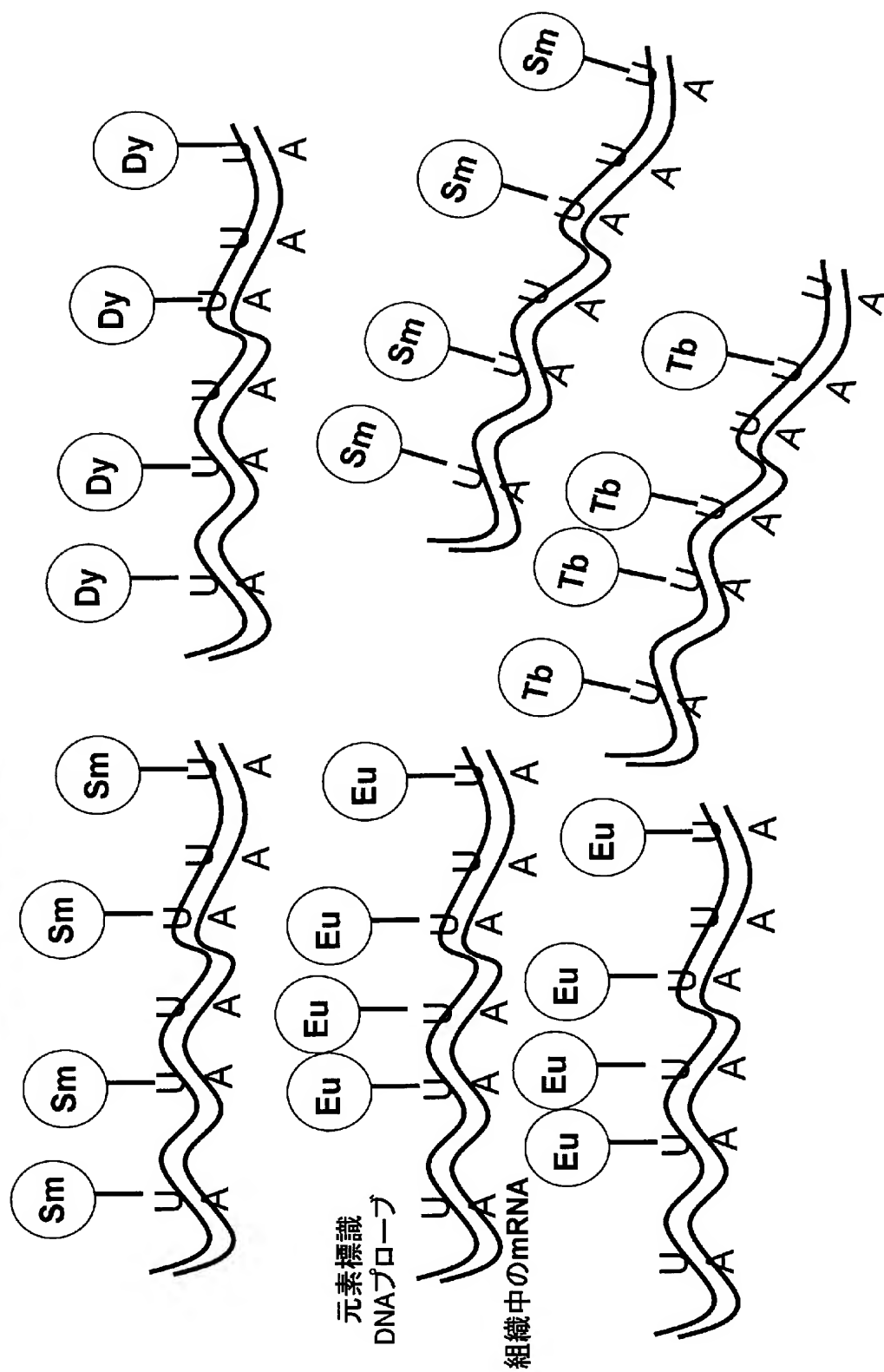
1 0	分析装置
1 2	真空槽
1 4	ターゲット
1 6	飛行時間型質量分析器（TOF 質量分析器）
1 8	回転導入端子
2 0	超短パルスレーザー発生装置
2 2	顕微鏡装置
2 4	画像解析装置



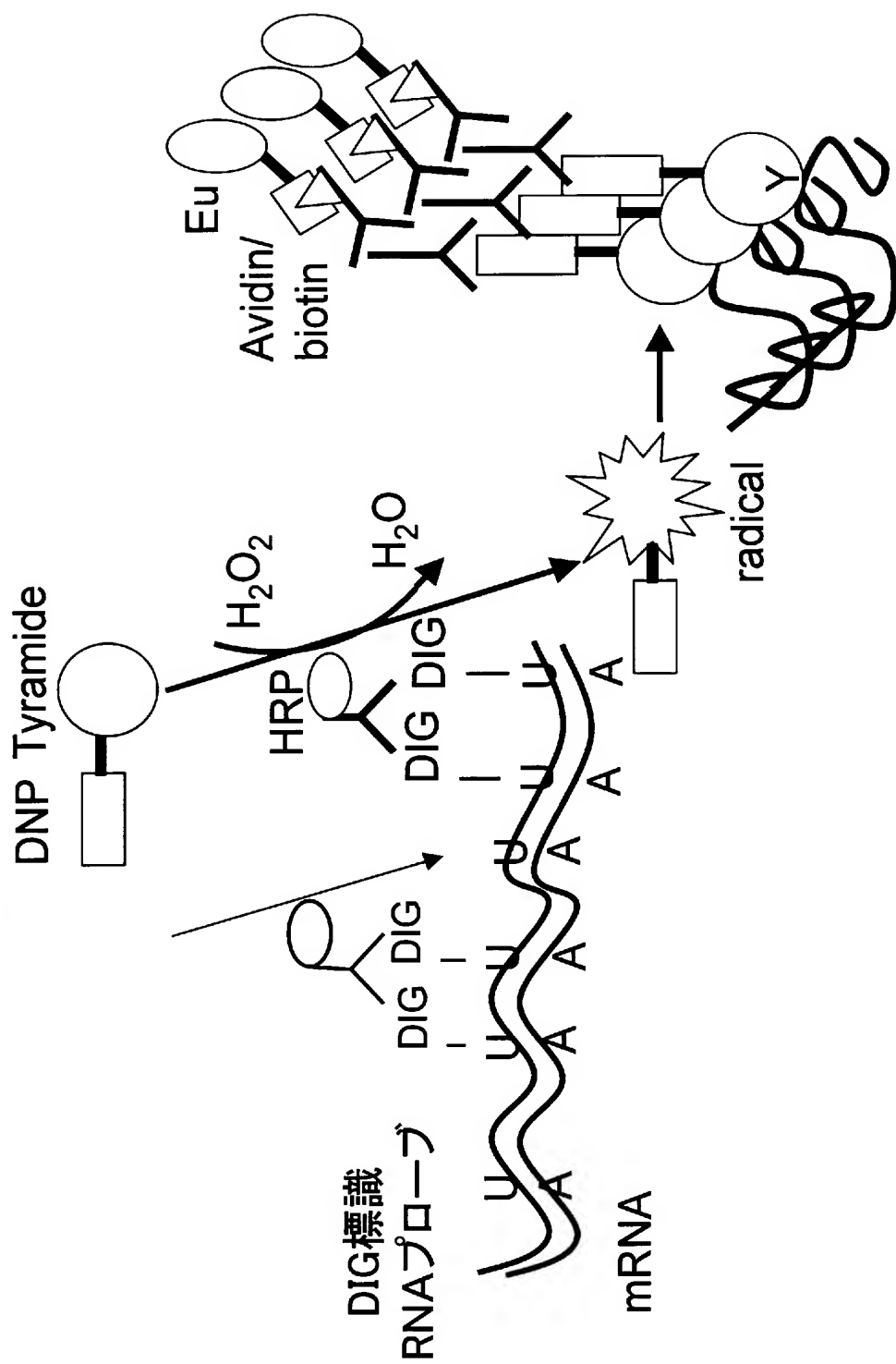
in situ ハイブリダイゼーションの原理 (TSA増感法による標識遺伝子の染色)

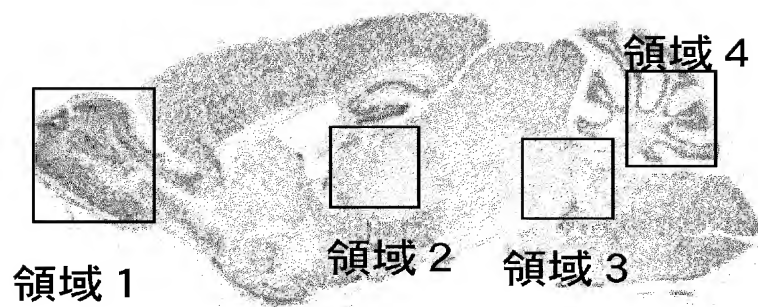


in situ ハイブリダイゼーションの原理 (同時多数プローブ法)



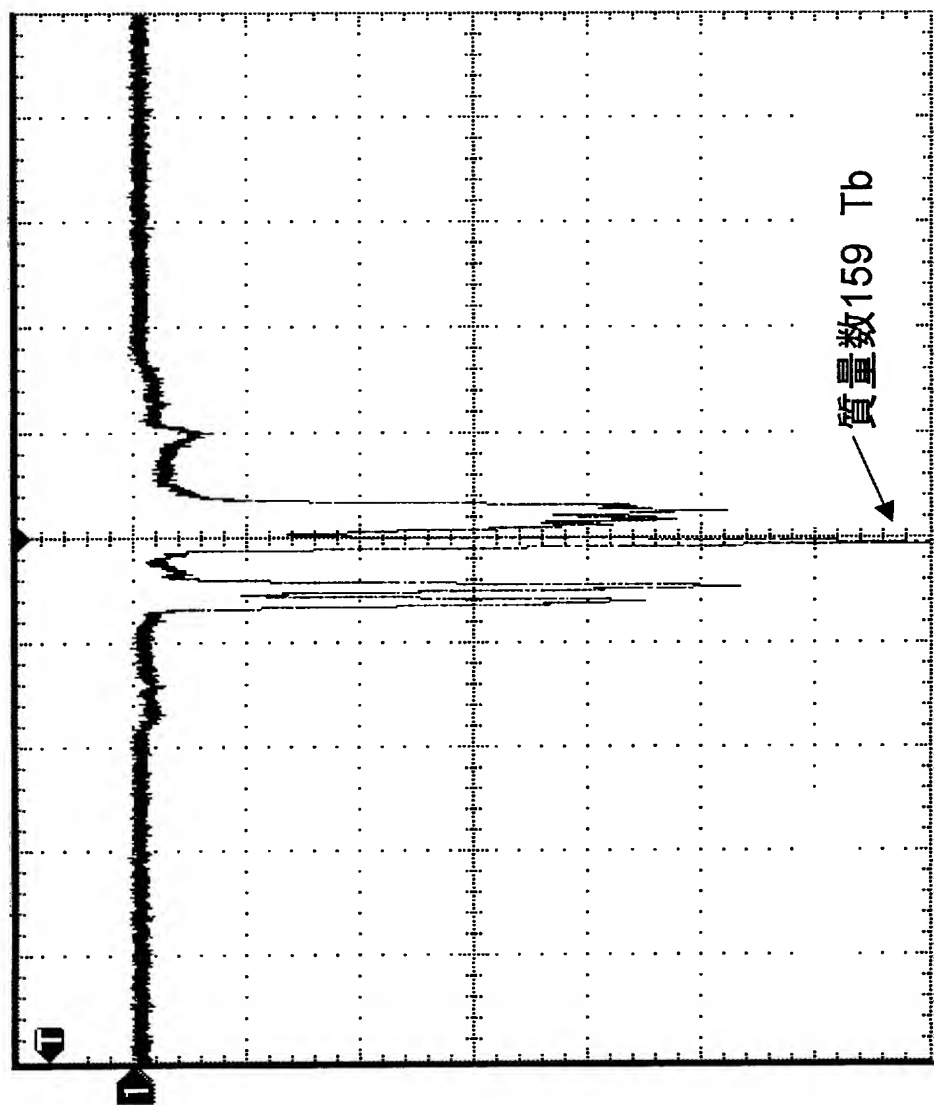
in situ ハイブリダイゼーションの原理 (単一プローブ増感法)





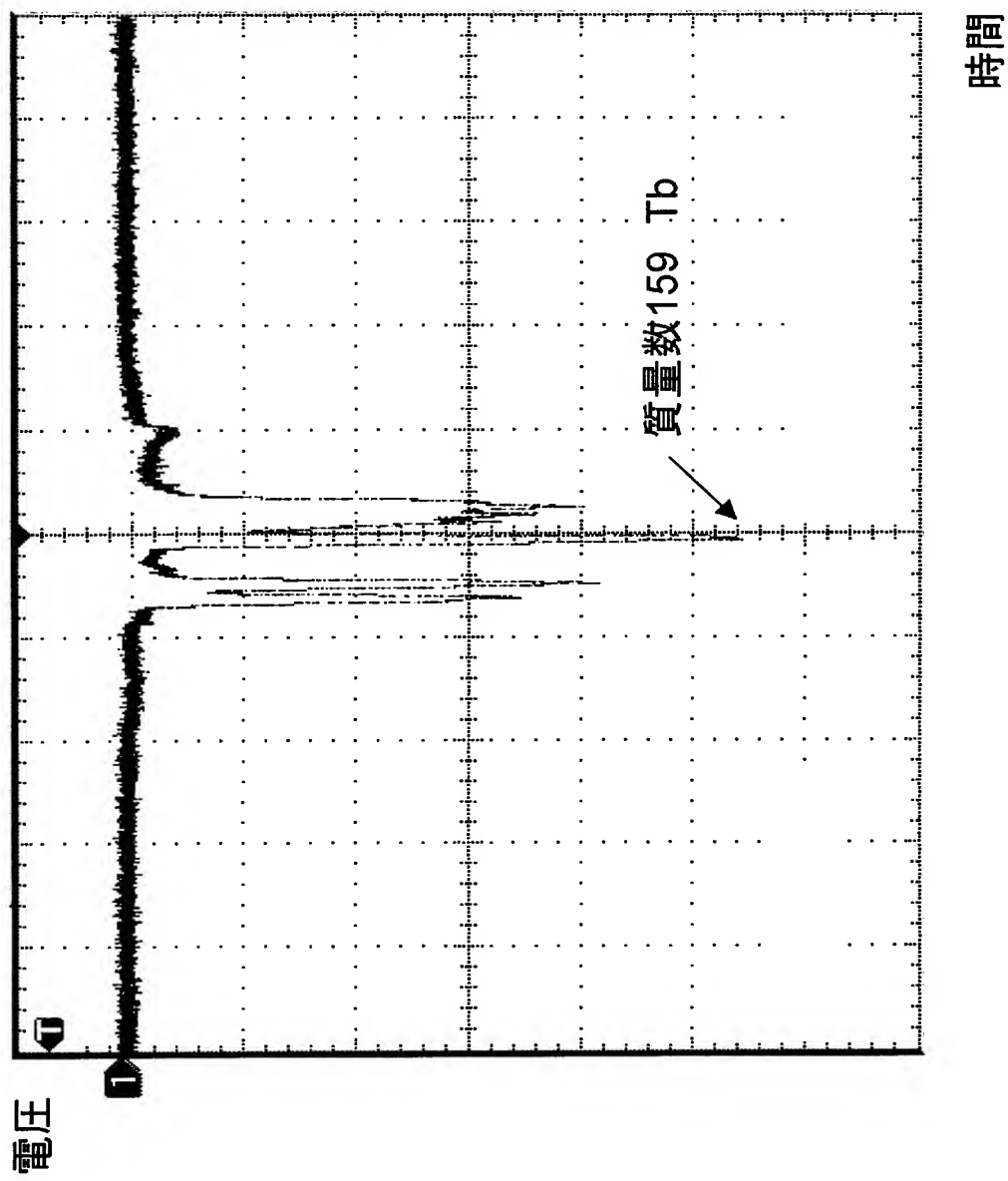
領域1

電圧

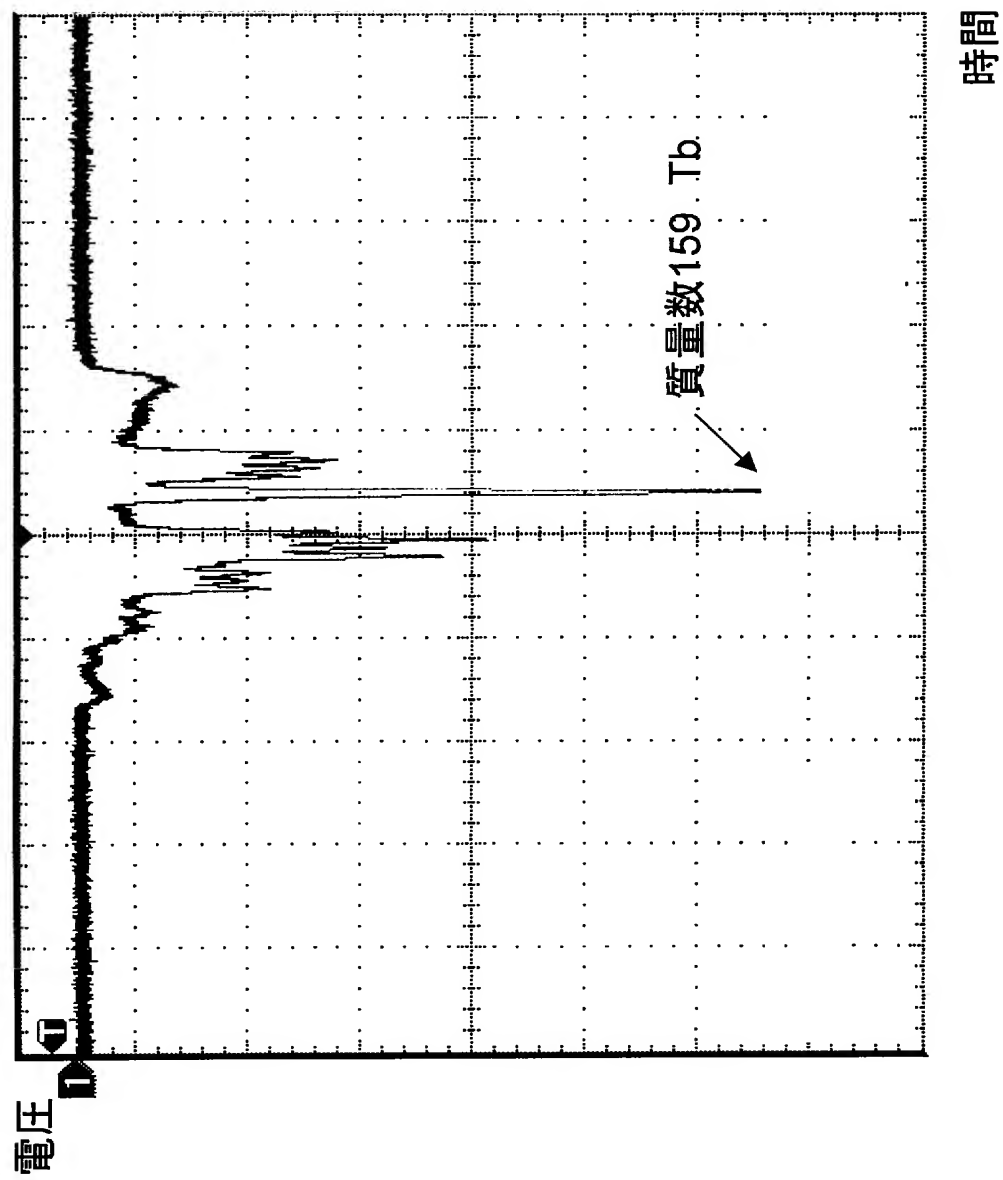


時間

領域2

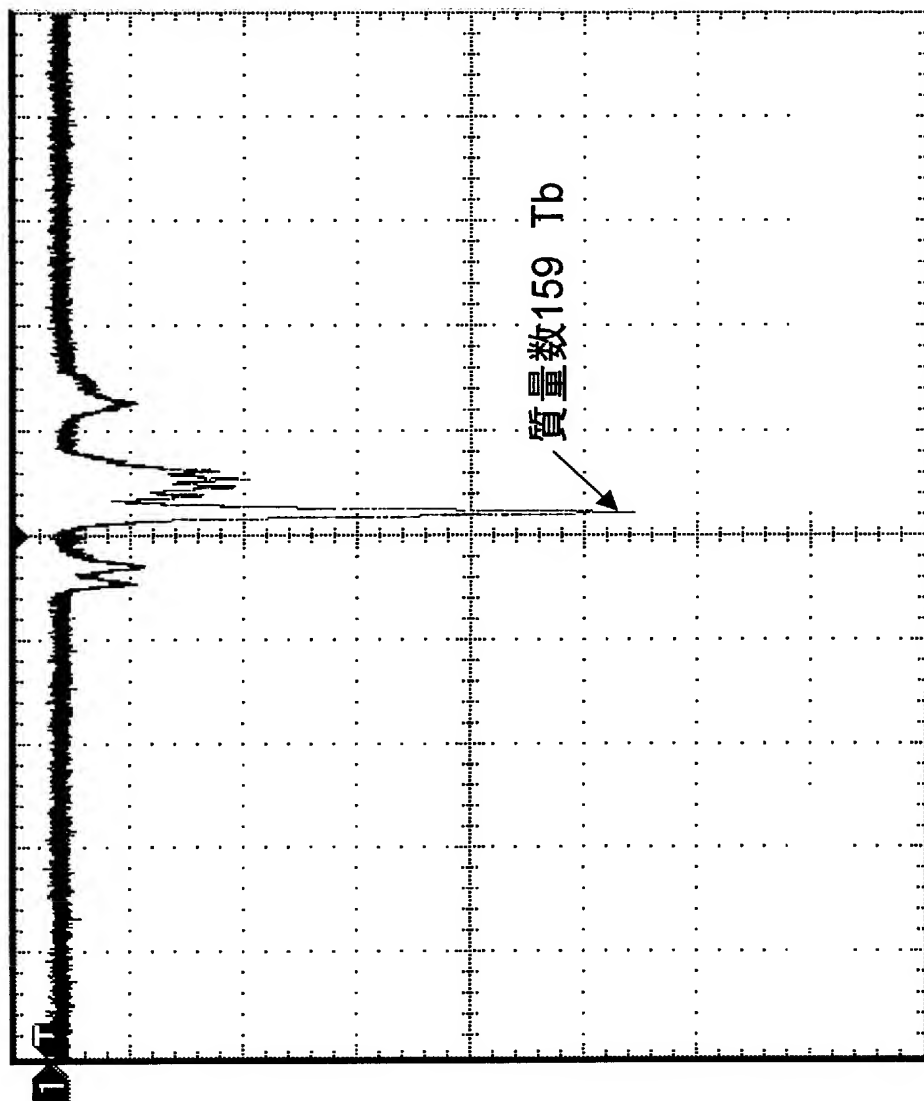


領域3



領域4

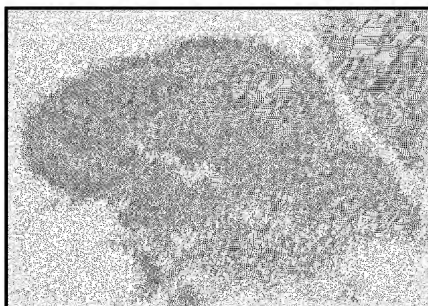
電圧



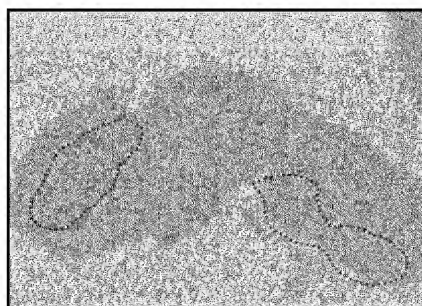
時間

領域	強度比			
	1	2	3	4
遺伝子1 (Tph2)	0	0	392.0	0
遺伝子2 (MaoB)	620.4	981.7	363.0	161.7
遺伝子3 (AACD)	870.4	1382.1	360.4	521.9
遺伝子4 (Htr1B)	281.0	455	197.0	345.0

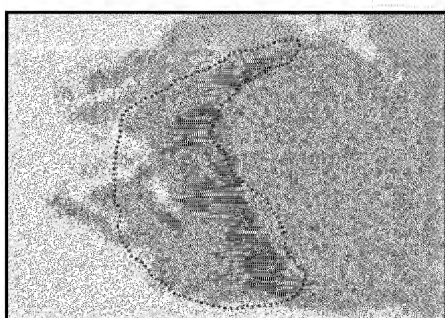
領域 1



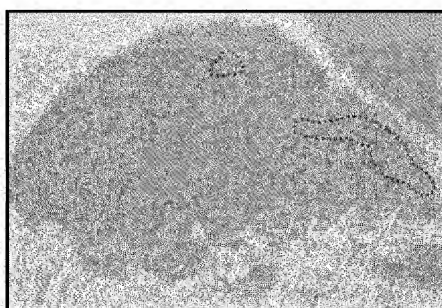
遺伝子 1



遺伝子 2

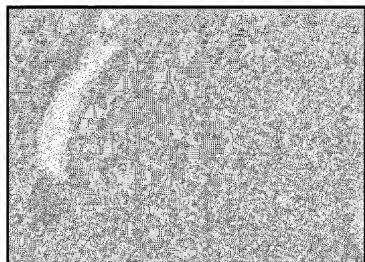


遺伝子 3

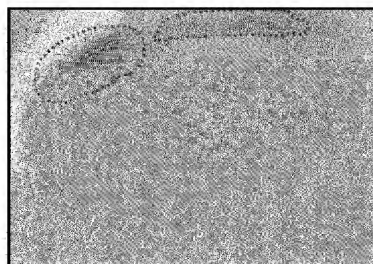


遺伝子 4

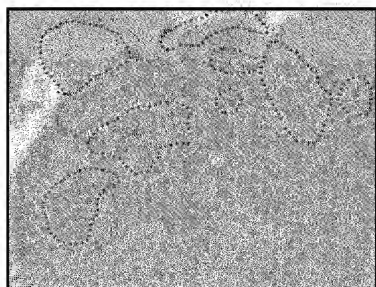
領域 2



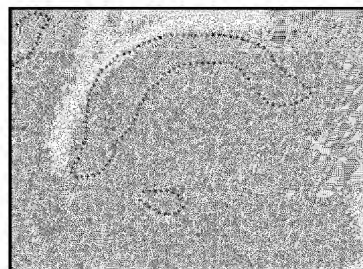
遺伝子 1



遺伝子 2

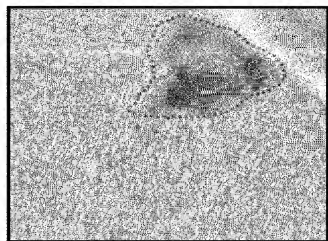


遺伝子 3

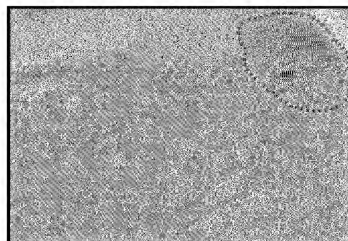


遺伝子 4

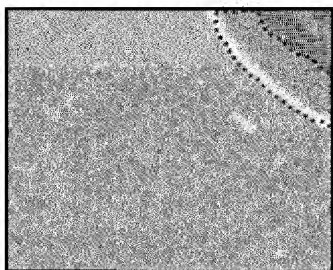
領域 3



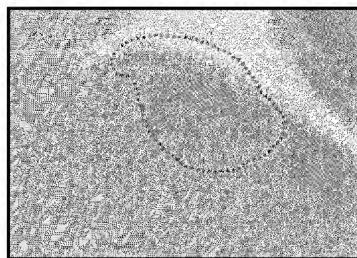
遺伝子 1



遺伝子 2

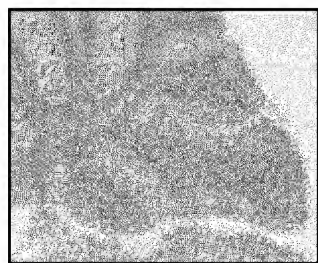


遺伝子 3

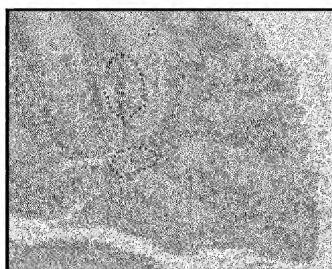


遺伝子 4

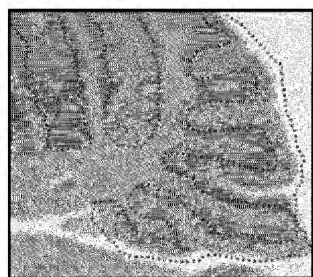
領域 4



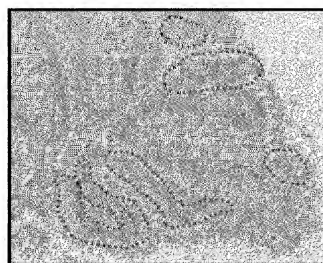
遺伝子 1



遺伝子 2



遺伝子 3



遺伝子 4

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 分析に要する時間を大幅に短縮することを可能にし、また、観察者により分析結果が左右されることのないようにして信頼性の高い結果を得ることを可能に、また、同一の生体試料上で一度に多数の遺伝子などを分析することができるようにして、作業労力的ならびに時間的な効率を向上するとともに、生体試料に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数の遺伝子などの解析を行うことを可能にする。

【解決手段】 分析の対象である生体試料に超短パルスレーザー光を照射してアブレーションすることにより、生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析することにより、生体試料中の分析を目的とする分子を分析する。

【選択図】 図 1

出願人履歴

5 0 3 3 5 9 8 2 1

20031001

新規登録

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

独立行政法人理化学研究所

5 0 1 2 9 3 6 6 6

20020326

住所変更

5 0 2 0 4 9 1 1 4

東京都港区三田 1 丁目 3 番 3 5 号

株式会社 グナフ オーム

5 9 7 1 5 7 1 7 4

20020318

住所変更

茨城県つくば市稲荷前 2 2 - 8

林崎 良英